Lumiprobe
Life science solutions

抗体标记试剂盒 (Antibody Labeling Kits)

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

简体中文: 抗体标记试剂盒 (Antibody Labeling Kits) 3-7

抗体标记试剂盒（Antibody Labeling Kits）

该试剂盒用于制备标记抗体，每个抗体具有2.5-3个标记。该试剂盒包含十个标记反应的所有试剂和材料，每个反应可标记100 ug 抗体。该染料是一种 NHS 酯，要控制使用量。它在弱碱性 pH 条件下与抗体上的赖氨酸氨基基团发生反应。抗体的纯化是通过使用硅胶离心柱来实现的。这些试剂盒包含磺化水溶性染料，最适合标记包括抗体在内的敏感蛋白。

试剂盒组分

试剂盒组分	数量						
	1321-10rxn 10 反应	3321-10rxn 10 反应	7321-10rxn 10 反应	5321-10rxn 10 反应	6321-10rxn 10 反应	1821-10rxn 10 反应	6821-10rxn 10 反应
N1320, sulfo-Cyanine3 NHS酯 (sulfo-Cyanine3 NHS ester), 1 rxn	10	—	—	—	—	—	—
N3320, 磺基-Cyanine5 NHS 酯 (sulfo-Cyanine5 NHS ester), 1 rxn	—	10	—	—	—	—	—
N7320, 磺基-Cyanine5.5 NHS酯 (sulfo-Cyanine5.5 NHS ester), 1 rxn	—	—	10	—	—	—	—
N5320, 磺基-Cyanine7 NHS 酯 (sulfo-Cyanine7 NHS ester), 1 rxn	—	—	—	10	—	—	—
N6320, 磺基-Cyanine7.5 NHS酯 (sulfo-Cyanine7.5 NHS ester), 1 rxn	—	—	—	—	10	—	—
N1820, AF 488 NHS 酯 (AF 488 NHS ester), 1 rxn	—	—	—	—	—	10	—
N2825, AF 594 NHS 酯 (AF 594 NHS ester), 1 rxn	—	—	—	—	—	—	10
A1115, Desalting spin column, PBS, 1 pcs	10	10	10	10	10	10	10
脱盐容器瓶, 1.5mL	10	10	10	10	10	—	—
脱盐废液瓶，2 mL	10	10	10	10	10	—	—
PBS 片，适用于 100 mL 缓冲液	1	1	1	1	1	—	—
15050, DMSO (dimethyl sulfoxide), labeling grade, 1 mL	1	1	1	1	1	1	1
1584-05mL, Sodium azide solution, 3%, 0.5 mL	1	1	1	1	1	1	1
1689-15mL, Sodium bicarbonate, 126 mg	1	1	1	1	1	1	1

16115, Desalting receptacle vial, 1.5 mL, 10 pcs	—	—	—	—	—	1	1
17115, Desalting waste vial, 2 mL, 10 pcs	—	—	—	—	—	1	1
11125, PBS tablet, for 100 mL of buffer, 1 pcs	—	—	—	—	—	1	1

保质期 12 个月。

方法

1. 抗体制备

标记反应的最佳条件如下：抗体以1 mg/mL的浓度溶解在0.1 M碳酸氢钠溶液中。叠氮化钠与标记试剂兼容。如果抗体浓度低于1 mg/mL，则需浓缩。抗体制备应不含氨基酸、BSA 等蛋白质以及会使 pH 值处于（2-7.5 或 9-12）不利范围的缓冲液成分。

2. 设置反应

2.1. 将含抗体的碳酸氢钠溶液（100 ug/100 uL*）添加到荧光团中，涡旋，并在室温下孵育 30 分钟。如果要标记的抗体量较少，则将冻干染料溶解在10 uL无水DMSO中，每10 ug抗体取1 uL溶液。染料溶于DMSO后，应尽快使用。

3. 标记抗体的纯化

3.1.准备离心过滤柱。使用前，柱子应于室温平衡。使用涡旋重新悬浮凝胶。将柱子放入适配的无盖管中，以 1,000 g 离心 2 分钟（必须仔细控制转速对于标准 6 cm 转子，1,000 g = 3,800 rpm）。柱子的凸出部分应朝外。

3.2. 用 400 uL的 1x PBS 缓冲液润洗，以 1,000 g 离心 2 分钟。

3.3.取出柱子。将其放入带盖的收集管中。将 100 uL 反应混合物上柱，孵

育 1 分钟， 1,000 g 离心 2 分钟洗脱抗体。添加 1/100 体积的 100x 叠氮化钠。抗体可以分装以延长其保质期。现用抗体可以储存在+4 °C，其余的可以储存在-20 °C。

4. 染料与抗体比值的测定

计算染料抗体比，测量偶联物的吸收光谱，即在280 nm (AAB) 或染料最大吸收峰 (ADye) 处的吸收值。染料标记抗体的典型吸收光谱如下图所示。根据染料的不同，最大吸收波长可能会有所不同。

标记抗体的吸收光谱包含染料峰（具有较长的波长）和抗体峰（280 nm 左右）。染料与抗体比使用以下公式计算：

其中 Dye/AB — 每个抗体分子的平均荧光团数，ADye — 样品在染料最大吸收处的光密度，AAB — 280 nm 处的样品光密度， ε AB — 280 nm 处抗体的摩尔消光系数（IgG 为 210,000）， ε Dye — 染料在最大吸收时的摩尔消光系数（见下表），CF280 — 染料的校正因子（见下表）。<.p>

计算示例

用sulfo-Cyanine5标记IgG抗体并纯化后，得到吸收光谱如上图。确定染料与蛋白质的比例。

由吸收光谱可得，染料最大吸收值（646 nm，见表）时的ADye = 0.184，IgG的 AAB = 0.066（280 nm）， ε AB =210,000； ε 染料 = 271,000，CF280 = 0.04。

染料/AB — 每个抗体有 2.43 个荧光团分子。

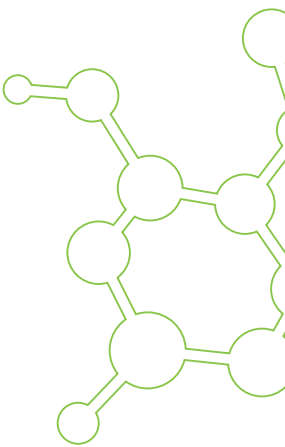
结果的判读和抗体储存

在大多数情况下，最佳染料与抗体比是每个抗体 2-3 个染料分子。由于荧光浓度猝灭，染料负载量增加到该值以上并不会改善荧光信号。当反应过程中附着的荧光团太少时，降低每次反应的抗体上样量。使用过期的试剂盒也会导致这种结果。

我们建议检测标记抗体与其抗原的结合。标记的抗体可保存在-20°C。当前

使用的试样应储存在 +4 ℃ 下，以避免冻融循环。偶联物的稳定性由抗体本身决定，而不是由荧光团或化学键决定。标记的抗体不应长时间暴露在阳光直射下，但可耐受环境光照。

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com